

**Deteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB) -
Bagian 1 :**

Metode *polymerase chain reaction* (PCR)





© BSN 2016

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar Isi

Prakata	ii
Pendahuluan.....	iii
1. Ruang Lingkup	1
2. Acuan Normatif.....	1
3. Istilah dan definisi	1
4. Prinsip umum.....	2
5. Peralatan	2
6. Bahan	3
7. Prosedur	3
8. Pengamatan hasil dan dokumentasi	6
9. Intepretasi hasil	6
10. Jaminan mutu	6
Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang.....	3
Tabel 2 - Komposisi bahan koktail PCR dengan <i>mastermix</i> komersial	5
Tabel 3 - Program amplifikasi	5
Tabel C.1 - Komposisi bahan koktail PCR dengan <i>PCR beads</i>	9
Tabel C.2 - Komposisi bahan koktail PCR.....	9
Gambar 1 - Hasil elektroforesis contoh uji yang telah diamplifikasi.....	6
Lampiran A (Informatif) Pembuatan larutan.....	7
Lampiran B (Informatif)_Prosedur ekstraksi	8
Lampiran C (Informatif)_Komposisi bahan koktail PCR	9
Bibliografi	10

Prakata

Standar Deteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB) - Bagian 1 : Metode *polymerase chain reaction* (PCR) ini menetapkan metode uji untuk mendeteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB), sebagai upaya pencegahan penyebaran penyakit hama dan penyakit ikan/hama penyakit ikan karantina (HPI/HPIK)

Standar ini merupakan rangkaian dari standar seri deteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB) yang memberikan beberapa alternatif metode uji sesuai dengan tingkat teknologi pada masing-masing laboratorium uji.

Standar ini dirumuskan oleh Komite Teknis 65-07 Perikanan Budidaya dan telah pada konsensus pada tanggal 6 Agustus 2015 di Tangerang Selatan, yang dihadiri oleh anggota Komite Teknis 65-07, wakil-wakil dari pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian/pakar dan instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui jajak pendapat pada tanggal 30 September 2015 sampai dengan 29 November 2015 dengan hasil akhir disetujui menjadi RASNI.



Pendahuluan

Peraturan yang dijadikan rujukan di dalam penyusunan standar ini adalah :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 28 tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan;
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. PER.19/Men/2010 tentang Pengendalian Sistem Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Pangan;
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan;
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke wilayah Republik Indonesia;
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI No. 26/Kepmen-KP/2013 tentang Penetapan Jenis-Jenis Hama dan Penyakit Ikan Karantina (HPIK), Golongan, Media Pembawa dan Penyebarannya.



Deteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB)-Bagian 1 : Metode *polymerase chain reaction* (PCR)

1. Ruang Lingkup

Standar ini menetapkan standar ini menetapkan deteksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB) dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) pada udang penaeid.

2. Acuan Normatif

SNI 7306, *Pengambilan dan pengiriman contoh air dan ikan untuk pemeriksaan penyakit.*

3. Istilah dan definisi

Untuk tujuan penggunaan dokumen ini, istilah dan definisi berikut digunakan

3.1

amplifikasi

pelipatgandaan bagian tertentu dari *deoxyribonucleic acid* (DNA) dengan bantuan reaksi enzim polimerase

3.2

annealing

proses penempelan primer pada DNA untai tunggal yang komplementer

3.3

denaturasi

proses pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal

3.4

ekstensi

proses pemanjangan primer dengan bantuan enzim DNA polimerase sehingga akan terbentuk DNA untai ganda

3.5

ekstraksi

proses pemisahan materi genetik dari kultur bakteri atau jaringan contoh uji

3.6

elektroforesis

proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan berat molekul dalam medan listrik

3.7

koktail

mastermix ditambah DNA *template*

3.8

mastermix

campuran yang terdiri dari DNA polimerase, primer, dNTPs, *buffer* dan DDW

3.9**pelet**

endapan yang terbentuk hasil sentrifugasi

3.10**primer**

oligonukleotida dengan urutan basa spesifik yang digunakan sebagai awal sintesis DNA secara *in vitro*

3.11**PCR**

reaksi berantai polimerase, merupakan perbanyakan untai DNA panjang tertentu secara *invitro* menggunakan enzim polimerase

3.12**supernatan**

cairan hasil sentrifugasi

3.13**pooling contoh uji**

gabungan beberapa contoh uji yang berasal dari satu lokasi pengambilan

3.14**template**

DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

4. Prinsip umum

Mengisolasi dan memurnikan DNA dari contoh uji yang diduga terinfeksi *necrotising hepatobacterium* (NHPB) untuk dideteksi dengan metode PCR.

5. Peralatan

- a) alat pengukur konsentrasi DNA berbasis spektrofotometri UV;
- b) alat elektroforesis gel agarosa;
- c) alat dokumentasi;
- d) *hot plate*;
- e) *laminar air flow*;
- f) *minimixer*;
- g) mikropipet berbagai ukuran 0,1 µl – 1 000 µl;
- h) peralatan bedah terdiri dari; pinset, gunting, dan pisau bedah;
- i) peralatan gelas;
- j) sentrifus;
- k) timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 mg;
- l) *thermal cycler*;
- m) transiluminator UV.

6. Bahan

- a) agarosa;
- b) alkohol 70 %;
- c) akuabides;
- d) asam asetat glasial;
- e) *tris acetate* EDTA (TAE) *bufer*;
- f) etanol p.a;
- g) isopropanol (*2-propanol*);
- h) kit ekstraksi DNA komersial dengan metode *spin column*;
- i) mikrotip berbagai ukuran 10 µl – 1 000 µl;
- j) masker;
- k) DNA *marker* (100 bp DNA *ladder*);
- l) *nuclease-free water* (DDW);
- m) penggerus jaringan (*pellet pestle*);
- n) pewarna DNA;
- o) reagensia PCR;
- p) sarung tangan (*powder-free*);
- q) 1 set primer spesifik (Nunan *et al.*, 2008) :
 - Primer *forward* : NHP F2 : 5' -CGT TGG AGG TTC GTC CTT CAG T- 3'
 - Primer *reverse* : NHP R2 : 5' -GCC ATG AGG ACC TGA CAT CAT C- 3'
- r) tabung mikro ukuran 0,2 ml; 1,5 ml – 2 ml;
- s) *tris base*.

CATATAN Pembuatan larutan dan media diuraikan pada Lampiran A.

7. Prosedur

7.1 Persiapan contoh uji

a) **Pooling contoh uji**

Kelompokkan contoh uji sesuai tabel 1:

Tabel 1 - Contoh uji berdasarkan stadia udang

Stadia udang	Organ target	Jumlah contoh uji
Telur	seluruh bagian	>150 Butir
Larva dan pascalarva	seluruh tubuh	50 ekor - 150 ekor
Tokolan	bagian hepatopankreas dan/atau feses	5 ekor
Dewasa	bagian hepatopankreas dan/atau feses	5 ekor

b) **Sampel/jaringan yang tidak direkomendasikan**

Contoh uji / jaringan yang tidak direkomendasikan adalah *midgut*, *caeca*, jaringan ikat, insang, haematopoietic, *haemocytes*, jaringan saraf, sel epitel, dan organ limfoid.

7.2 Ekstraksi DNA dengan metode *spin column*

- a) panaskan *elution buffer* pada 70 °C sebelum proses dimulai sampai akan digunakan (langkah butir t);
- b) masukkan 25 mg - 50 mg contoh uji ke dalam tabung mikro 1,5 ml ;
- c) tambahkan 200 µl *tissue lysis buffer* dan 40 µl *proteinase K* kemudian homogenkan;
- d) inkubasikan selama 1 jam pada 55 °C;
- e) tambahkan 200 µl *binding buffer* dan homogenkan;
- f) inkubasikan 10 menit pada 70 °C;
- g) tambahkan 100 µl isopropanol dan homogenkan;
- h) buang bagian contoh uji yang tidak terlarut dengan mikropipet;
- i) pasang *high filter tube* dengan *collection tube*;
- j) pipet seluruh cairan contoh uji dan masukkan ke bagian atas kombinasi *tube* tersebut;
- k) sentrifugasi selama 1 menit pada 8 000 x g;
- l) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi;
- m) pasang kembali *filter tube* dengan *collection tube* yang baru;
- n) tambahkan 500 µl *inhibitor removal buffer* ke dalam bagian atas *filter tube*
- o) sentrifugasi selama 1 menit pada 8 000 x g;
- p) pisahkan *filter tube* dari *collection tube* dan buang larutan hasil sentrifugasi;
- q) pasang kembali *filter tube* dengan *collection tube* yang baru;
- r) tambahkan 500 µl *wash buffer* ke dalam bagian atas *filter tube*;
- s) sentrifugasi selama 1 menit pada 8 000 x g dan buang larutan hasil sentrifugasi;
- t) pasang kembali *filter tube* dengan *collection tube*;
- u) sentrifugasi kembali selama 10 detik pada kecepatan maksimal;
- v) buang *collection tube*;
- w) pasang *filter tube* dengan 1,5 ml tabung mikrosentrifus steril (*nuclease free*);
- x) tambahkan 200 µl *elution buffer* yang telah dipanaskan ke dalam bagian atas *filter tube*;
- y) sentrifugasi selama 1 menit pada 8 000 x g;
- z) gunakan larutan DNA secara langsung untuk PCR atau simpan pada -15 °C sampai dengan -25 °C untuk analisis lebih lanjut.

CATATAN 1 Prosedur *spin column* di atas merupakan contoh ekstraksi DNA yang menggunakan kit komersial.

CATATAN 2 Prosedur ekstraksi DNA disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan.

7.3 Pengukuran DNA

- a) Ukur konsentrasi DNA dengan alat pengukur konsentrasi DNA pada panjang gelombang 260 nm. Hitung konsentrasi DNA dengan menggunakan rumus:

$$\text{Konsentrasi DNA} = A_{260} \times 50 \times \text{faktor pengenceran}$$

Keterangan:

A_{260} = Nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 nm

- b) lakukan pengenceran apabila konsentrasi yang diperoleh lebih tinggi dari yang diperlukan;
- c) periksa kemurnian DNA dengan menghitung perbandingan hasil pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (A_{260}/A_{280});
- d) simpan larutan DNA pada -20 °C apabila tidak langsung digunakan.

CATATAN Prosedur pengukuran DNA disesuaikan dengan alat yang digunakan

7.4 Amplifikasi

- setiap analisis NHPB dengan PCR harus ada kontrol NHPB positif dari contoh uji dan kontrol negatif;
- siapkan reaksi PCR dengan komposisi sebagai berikut:

Tabel 2 - Komposisi bahan koktail PCR dengan *mastermix* komersial

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
<i>nuclease-free water</i> (DDW)	9,5	
2 x <i>mastermix</i>	12,5	1 x
Primer NHP F2 (10 µM)	0,5	200 nM
Primer NHP R2 (10 µM)	0,5	200 nM
DNA <i>template</i>	2,0	10 ng -100 ng
Total	25	

CATATAN Komposisi koktail disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan dan sudah divalidasi

- setelah semua bahan dicampur kecuali *template*, bagikan ke dalam tabung mikro 0,2 ml dengan volume masing-masing 23 µl;
- tambahkan *template* atau contoh uji DNA, termasuk kontrol positif dan kontrol negatif (DDW), pada masing-masing tabung mikro sebanyak 2 µl;
- homogenkan dan masukkan tabung mikro ke dalam mesin PCR (*thermal cycler*).

Tabel 3 - Program amplifikasi

Proses	Suhu (°C)	Waktu	Siklus
Denaturasi awal	95	5 menit	1
Amplifikasi	95	30 detik	35
	60	30 detik	
	72	30 detik	
Ekstensi akhir	60	1 menit	1
	72	2 menit	1

- setelah proses berakhir, matikan *thermal cycler* dan keluarkan tabung mikro;
- produk PCR siap dielektroforesis.

CATATAN Komposisi reaksi dan prosedur amplifikasi PCR disesuaikan dengan kit komersial yang digunakan

7.5 Elektroforesis

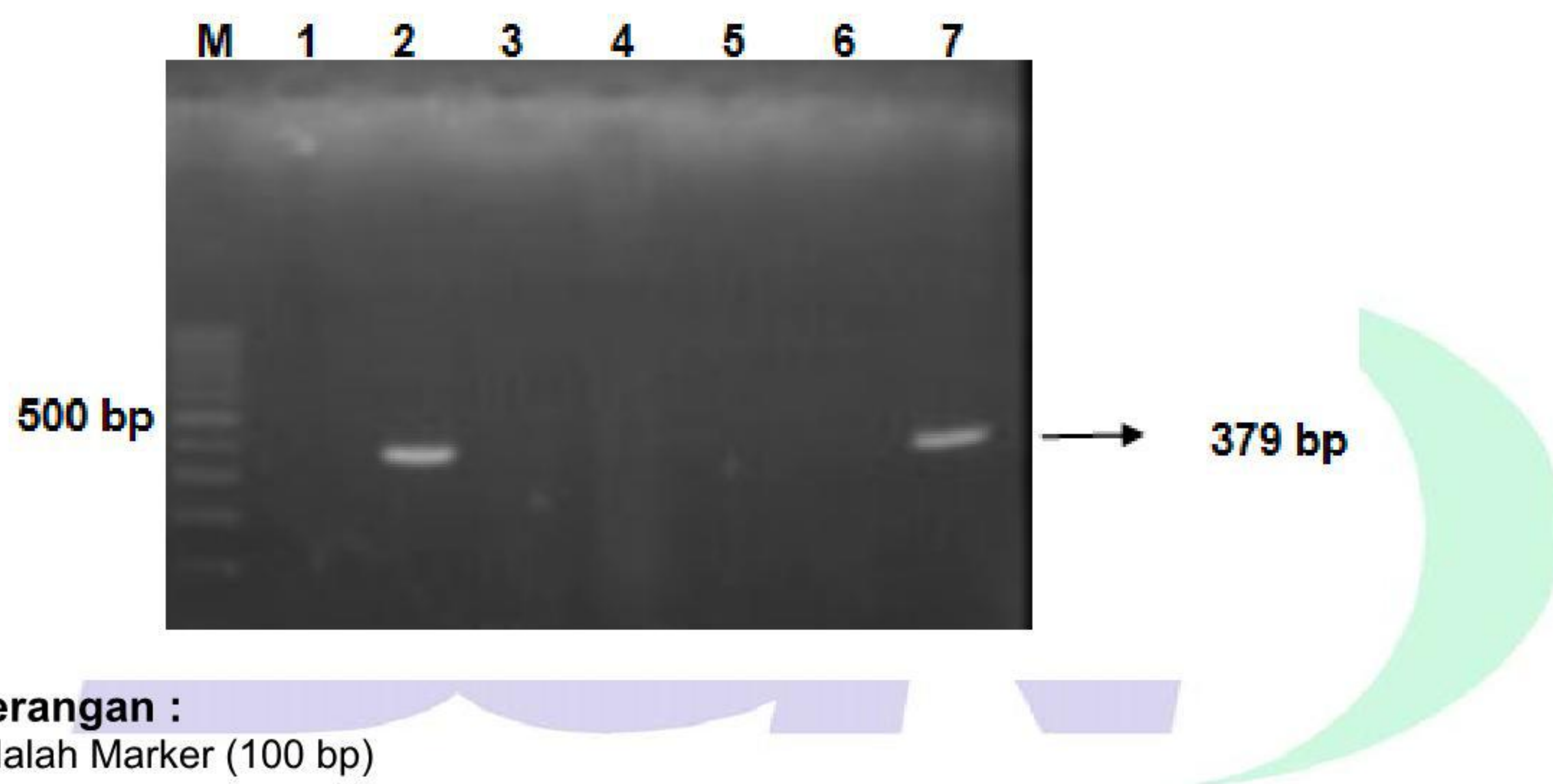
- letakkan gel agarosa yang sudah dicetak di atas *chamber* elektroforesis;
- isi *chamber* dengan larutan TAE 1x sebanyak 500 ml (sampai gel terendam);
- tambahkan 5 µl 6x *loading buffer* ke dalam produk PCR (contoh uji, kontrol positif dan kontrol negatif), campur dengan baik.
- masukkan 5 µl *marker* atau penanda DNA (100 bp DNA *ladder*);
- masukkan produk PCR yang sudah tercampur dengan *loading dye* dengan mikropipet ke dalam sumur (*well*) gel agarosa sebanyak 8 µl;
- pasang tutup elektroforesis dan alirkan listrik dengan voltase diatur 100 V - 150 V selama 30 menit.

8. Pengamatan hasil dan dokumentasi

- angkat gel agarosa setelah proses elektroforesis selesai;
- rendam gel agarosa dalam larutan zat pewarna DNA selama 10 menit;
- bilas gel agarosa dengan akuades selama 10 menit atau air mengalir selama 3 menit; amati dan dokumentasikan.

9. Intepretasi hasil

- hasil positif NHPB apabila terlihat pita DNA dengan ukuran 379 bp;
- hasil negatif apabila tidak terlihat pita DNA dengan ukuran 379 bp;



Keterangan :

- M adalah Marker (100 bp)
 1 adalah kontrol negatif NHPB
 2 adalah kontrol positif NHPB (379 bp)
 3 adalah contoh uji negatif NHPB
 4 adalah contoh uji negatif NHPB
 5 adalah contoh uji negatif NHPB
 6 adalah contoh uji negatif NHPB
 7 adalah kontrol positif NHPB (379 bp)

Gambar 1 - Hasil elektroforesis contoh uji yang telah diamplifikasi

10. Jaminan mutu

- hasil ekstraksi DNA mempunyai rasio A 260/ A 280 berkisar 1,8 – 2,1;
- proses amplifikasi dijamin kualitasnya dengan menyertakan kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan hasil yang konsisten.

Lampiran A (Informatif) Pembuatan larutan

A.1 Pembuatan larutan 20 x TAE dan 1x TAE

- larutan 1 : timbang 15,77 g EDTA 3 Na + 100 ml akuades steril dan atur pH menjadi 8 menggunakan larutan NaOH;
- larutan 2 : timbang 96,8 g tris + 28 g asam asetat (\pm 30 ml) + 900 ml akuades steril;
- campurkan kedua larutan dan setarakan pada pH 8;
- buat larutan 1x TAE (siap pakai), larutkan 1 bagian larutan stok dengan 19 bagian akuades steril. Untuk membuat larutan 1 liter 1x TAE adalah : ambil 50 ml larutan 20x TAE kemudian diencerkan dalam 950 ml akuades steril).

A.2 Pembuatan pewarna DNA (10 mg/ml)

- tambahkan 1 g pewarna DNA ke dalam 100 ml akuades;
- aduk dengan *magnetic stirrer* beberapa jam sampai pewarna DNA terlarut;
- bungkus tabung dengan aluminium foil atau pindahkan ke dalam botol gelap dan simpan pada suhu kamar;
- untuk membuat larutan pewarnaan (siap pakai), ambil 10 μ l pewarna DNA 1 % kemudian diencerkan ke dalam 100 ml akuades, campurkan, larutan siap digunakan.

A.3 Pembuatan gel agarosa 2 %

- timbang 2 g bubuk agarosa dan masukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 250 ml. Larutkan dengan 100 ml bufer 1x TAE lalu panaskan di atas *hot plate* sampai mendidih atau larutan menjadi bening
- tuang gel agarosa setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel agarosa yang telah dipasang sisir;
- tunggu sampai gel agarosa mengeras dan siap digunakan.

A.4 Pembuatan alkohol 70 %

Ambil 70 ml alkohol 96 % kemudian tambahkan 26 ml akuades.

Lampiran B (Informatif) Prosedur ekstraksi

B.1 Ekstraksi DNA menggunakan *lysis buffer*

- masukkan hepatopankreas sebanyak 20 mg atau sebanyak 25 ekor - 50 ekor (pascalarva < PL 12) ke dalam tabung mikro ukuran 1,5 ml;
- tambahkan 500 μ l *lysis buffer* ke dalam mikrotube kemudian hancurkan hingga homogen;
- inkubasikan dalam 95 °C selama 10 menit;
- sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm (4 800 x g dengan r = 3 cm) selama 10 menit;
- pindahkan supernatan sebanyak 200 μ l ke dalam mikrotube baru ukuran 1,5 ml dan tambahkan 400 μ l alkohol 95 %;
- homogenkan, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm (4 800 x g dengan r = 3 cm) selama 5 menit;
- uang alkohol, lalu keringkan pelet;
- larutkan pelet dengan DDW atau bufer TE;
- DNA siap digunakan, jika tidak langsung digunakan maka harus disimpan pada suhu - 20°C.



Lampiran C (Informatif)
Komposisi bahan koktail PCR

Tabel C.1 - Komposisi bahan koktail PCR dengan *PCR beads*

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
<i>nuclease-free water</i> (DDW)	22	-
<i>Primer NHP F2</i>	0,5	0,5 µM
<i>Primer NHP R2</i>	0,5	0,5 µM
<i>DNA template</i>	2	10 ng -100 ng
Total	25	

Tabel C.2 - Komposisi bahan koktail PCR

Komposisi	Volume (µl)	Konsentrasi akhir
<i>nuclease-free water</i> (DDW)	14,875	
5x PCR buffer	5,0	1 x
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP <i>mix</i> (10 mM)	0,5	200 µM
primer NHP F2 (10 µM)	0,5	200 nM
primer NHP R2 (10 µM)	0,5	200 nM
<i>Taq DNA polymerase</i> (5 U/ µl)	0,125	0,625 U
<i>DNA template</i>	2,0	10 ng -100 ng
Total	25	

Bibliografi

- [1] OIE *Manual of diagnostic tests for aquatic animal* 2015. Chapter 2.2.4. – *Necrotising hepatopancreatitis*
- [2] Nunan, L. M., Carlos Pantoja, Donald V. Lightner. 2008. *Improvement of a PCR method for the detection of necrotizing hepatopancreatitis in shrimp*. Dis Aquat Org. 80: 69–73.

